

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) ゲノム医療実現推進プラットフォーム事業
(英語) Platform Program for Promotion of Genome Medicine

研究開発課題名： (日本語) 保存血清のメタボローム解析による疾患診断の有用性の検証と応用
(英語) Metabolomics analysis for development of liquid biopsy by using sera from disease patients

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部医化学教室 専任講師 加部泰明
所属 役職 氏名： (英語) Department of Biochemistry, School of Medicine, Keio University
Associate Professor, Yasuaki Kabe

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究者

分担研究 (日本語) 血清試料における遺伝情報収集技術の実施と品質評価
開発課題名： (英語) Development of a novel exosome detection system

(日本語) 慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター 教授 小崎健次郎
所属 役職 氏名： (英語) Center of clinical genomics, School of Medicine, Keio University
Professor, Kenjiro Kosaki

分担研究 (日本語) レクチンアレイによる慢性疾患の異常糖鎖検出
開発課題名： (英語) Detection of disease-related glycosylation using lectin microarray

(日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所

所属 役職 氏名：(英 語) Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, Principal Research Manager, Hisashi Narimatsu

分担研究 (日本語) チオールプロテオームによる慢性疾患マーカーの探索

開発課題名： (英 語) Investigation of markers of chronic diseases by using thiol proteome

研究開発分担者 (日本語) 東北大学大学院医学系研究科 教授 赤池孝章

所属 役職 氏名：(英 語) Tohoku University Graduate School of Medicine, Professor, Takaaki Akaike

II. 成果の概要 (総括研究報告)

(和文)

本事業では、疾患特異的な保存血清試料の代謝解析の有用性を十分に検証した上で、バイオバンク・ジャパン (BBJ) に登録されている 47 疾患のうち、悪性腫瘍の一部、肺線維症、肺気腫などの呼吸器疾患、慢性関節リウマチなどの感染症を対象とし、①代謝分子、②生体遺伝情報内封因子 (エキソソーム)、③疾患異常糖鎖、④血中チオール修飾タンパク、に関する先端計測技術を駆使して、疾患バイオマーカー探索を行い、有用なマーカーの組合せによる特異性の高い診断方法の確立することを目的とする。

① 保存血清のメタボロミクスの実施と血清試料の品質評価

BBJ の有する血清試料についてメタボローム解析を行い、ほとんどの代謝物質では凍結保存期間や温度による顕著な変動は無く、この品質がメタボローム解析に資するものであることを明らかとした。そこで、水溶性代謝物質の網羅的メタボローム解析により疾患特異的な代謝変動解析を行い、特に大腸がんと卵巣がんについて特異的に変動の見られる代謝物の絞り込みが終了している。また、100 成分以上の脂溶性代謝物が検出/定量できるシステムを構築し、リノレイン酸の LOX 代謝産物の 3 化合物が特に大腸がん血清でいずれも顕著に増加することを見出している。

② 血清試料における遺伝情報収集技術の実施と品質評価

miRNA などの遺伝情報が内包され、がんの成長と転移にも関与するエキソソームの新規の高感度定量計測技術の開発を行い (MicroTAS, 2014)、がん細胞株由来のエキソソームを検出し、非常に高感度かつ正確にカウント出来るシステムを確立した。BBJ 血清サンプルを用いた疾患に応じたエキソソーム量の変動の解明を目指して解析を行い、乳がん、卵巣がん血清において HER2 や CD147 などのがん抗原を含むエキソソームが検出できることを見出した。

③ レクチンアレイによる慢性疾患の異常糖鎖検出 (産業技術総合研究所)

血清タンパク質上の糖鎖構造を網羅的に識別可能なレクチンアレイを用いて、慢性関節リウマチ患者血清の解析を行い、メタロプロテアーゼ MMP3 の糖鎖変動が関節リウマチの活動性に強く相関することを見出した (Arthritis Res Ther. 2016)。さらに、胆管癌血清中に含まれるムチンタンパク質 Muc1 の糖鎖解析から、糖鎖構造 WFA の付加ががん疾患特異的に変動する事を見出した (J Gastroenterol. 2016、Anal Chem. 2015)。

④ チオールプロテオームによる慢性疾患バイオマーカーの探索 (東北大学)

疾患特異的なタンパク質ポリサルファ化修飾パターンを検出するために、ポリサルファ化タンパク質を特異的に標識する方法を開発し、化学反応性の異なる各種親電子剤を組み合わせたポリサルファ化解析法 (PEG-maleimide-labeling gel shift assay, PMSA) および、各種タンパク質のポリサルファ化修飾を定量的に評価できる解析法を確立した (Biochem Biophys Res Commun. 2016)。さらに、タンパク質翻訳に共役した新規な生体内ポリサルファ生成機構を発見し、このポリサルファ生成系がミトコンドリア機能制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした (Free Radic Biol Med. 2017)。

(英文)

Our research aims to develop a novel biomarker for diagnosis of several diseases including cancer, inflammation or respiratory disorder by using serum bank of a large patient-based registry of BioBank Japan (BBJ) Project. To elucidate disease specific markers in sera, we integrated four advanced technologies as follows: 1. Metabolome system for systematically detecting metabolites, 2. High sensitive exosome counting system, 3. Lectin array system for analyzing difference of sugar chain on proteins, 4. Detection system of the sulfur-modification of proteins.

1. Metabolome analyses by using sera from disease patients

To clarify the quality of sera in BBJ, we analyzed the different stock samples by metabolome system. Almost of metabolites in sera were not affected by storage time or temperature, suggesting that the quality of sera from BBJ is suitable for using metabolomics analyses. By using cross-sectional cohort samples of sera, we found several water-soluble metabolites were specifically changed in sera from colon cancer patients. Furthermore, systematic analysis of lipid metabolites revealed that three linolenic acid-derived metabolites were increased in colon cancer sera, indicating that lipoxygenase pathway was up-regulated in the cancer lesion.

2. Development of a novel exosome detection system

Circulating exosomes in blood play crucial roles in cancer development and progression. We have developed a novel device to determine the absolute number of exosomes in sera without complicated enrichment procedures. We found that HER2-positive exosomes are significantly elevated in patients with breast cancer or ovarian cancer versus healthy subjects or those with non-cancer diseases.

3. Identification of disease-specific sugar chain alterations by lectin array analysis

We had developed the lectin array system which can systematically detect the alteration of glycosylation status on proteins. By using this system, we found that the sugar chain on metalloprotease MMP3 was specifically changed in sera from rheumatoid arthritis patients (Arthritis Res Ther. 2016). Furthermore, we also identified that the WFA lectin-binding mucin 1 was elevated in sera from lung cancer patients (J Gastroenterol. 2016, Anal Chem. 2015).

4. Analysis of the thiol proteome system with chronic inflammation samples

Several serum proteins were modified with sulfides on the Cys residue during stress response. We developed the PEG-maleimide-labeling gel shift assay for identification of poly sulfide proteins. By using this system, we found that irrelevant poly sulfide-modification was associated in chronic inflammation disorder (Free Radic Biol Med. 2017).

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 29 件）

1. Kabe Y, Yamamoto T, Kajimura M, Sugiura Y, Koike I, Ohmura M, Nakamura T, Tokumoto Y, Tsugawa H, Handa H, Kobayashi T, Suematsu M. Cystathionine β -synthase and PGRMC1 as CO sensors. *Free Radic Biol Med.* 99:333-344 (2016).
2. Nishimoto K, Seki T, Hayashi Y, Mikami S, Al-Eyd G, Nakagawa K, Morita S, Kosaka T, Oya M, Mitani F, Suematsu M, Kabe Y, Mukai K. Human Adrenocortical Remodeling Leading to Aldosterone-Producing Cell Cluster Generation. *Int J Endocrinol.* 2016:7834356 (2016).
3. Takeshita M, Kuno A, Suzuki K, Matsuda A, Shimazaki H, Nakagawa T, Otomo Y, Kabe Y, Suematsu M, Narimatsu H, Takeuchi T. Alteration of matrix metalloproteinase-3 O-glycan structure as a biomarker for disease activity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 18(1):112 (2016).
4. Kabe Y, Nakane T, Koike I, Yamamoto T, Sugiura Y, Harada E, Sugase K, Shimamura T, Ohmura M, Muraoka K, Yamamoto A, Uchida T, Iwata S, Yamaguchi Y, Krayukhina E, Noda M, Handa H, Ishimori K, Uchiyama S, Kobayashi T, Suematsu M. Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance. *Nat Commun.* 7:11030 (2016).
5. Suematsu M, Nakamura T, Tokumoto Y, Yamamoto T, Kajimura M, Kabe Y. CO-CBS-H2S Axis: From Vascular Mediator to Cancer Regulator. *Microcirculation.* 23(3):183-90 (2016).
6. Pati ML, Groza D, Riganti C, Kopecka J, Niso M, Berardi F, Hager S, Heffeter P, Hirai M, Tsugawa H, Kabe Y, Suematsu M, Abate C. Sigma-2 receptor and progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) are two different proteins: Proofs by fluorescent labeling and binding of sigma-2 receptor ligands to PGRMC1. *Pharmacol Res.* 117:67-74 (2017).
7. Nishimoto K, Koga M, Seki T, Oki K, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Naruse M, Sakaguchi T, Morita S, Kosaka T, Oya M, Ogishima T, Yasuda M, Suematsu M, Kabe Y, Omura M, Nishikawa T, Mukai K. Immunohistochemistry of aldosterone synthase leads the way to the pathogenesis of primary aldosteronism. *Mol Cell Endocrinol.* 441:124-133 (2017).
8. Uchida T, Nishimoto K, Fukumura Y, Asahina M, Goto H, Kawano Y, Shimizu F, Tsujimura A, Seki T, Mukai K, Kabe Y, Suematsu M, Gomez-Sanchez CE, Yao T, Horie S, Watada H. Disorganized Steroidogenesis in Adrenocortical Carcinoma, a Case Study. *Endocr Pathol.* 28(1):27-35 (2017).
9. Tamura A, Nishimoto K, Seki T, Matsuzawa Y, Saito J, Omura M, Gomez-Sanchez CE, Makita K, Matsui S, Moriya N, Inoue A, Nagata M, Sasano H, Nakamura Y, Yamazaki Y, Kabe Y, Mukai K, Kosaka T, Oya M, Suematsu S, Nishikawa T. Somatic KCNJ5 mutation occurring early in adrenal development may cause a novel form of juvenile primary aldosteronism. *Mol Cell Endocrinol.* 441:134-139. (2016).
10. Tokumoto Y, Tamaki S, Kabe Y, Takubo K, Suematsu M. Quiescence of adult oligodendrocyte precursor cells requires thyroid hormone and hypoxia to activate Runx1. *Sci Rep.* 21;7(1):1019 (2017).

11. Lai KKY, Kweon SM, Chi F, Hwang E, Kabe Y, Higashiyama R, Qin L, Yan R, Wu RP, Lai K, Fujii N, French S, Xu J, Wang JY, Murali R, Mishra L, Lee JS, Ntambi JM, Tsukamoto H. Stearoyl-CoA Desaturase Promotes Liver Fibrosis and Tumor Development in Mice via a Wnt Positive-Signaling Loop by Stabilization of Low-Density Lipoprotein-Receptor-Related Proteins 5 and 6. *Gastroenterology*. ;152(6):1477-1491. (2017).
12. Fujii S, Sawa T, Nishida M, Ihara H, Ida T, Motohashi H, Akaike T. Redox signaling regulated by an electrophilic cyclic nucleotide and reactive cysteine persulfides. *Arch Biochem Biophys*. 2016, 595, 140-146.
13. Kawamura Y, Tomida J, Miyoshi-Akiyama T, Okamoto T, Narita M, Hashimoto K, Cnockaert M, Vandamme P, Morita Y, Sawa T, Akaike T. Proposal of *Helicobacter canicola* sp. nov., previously identified as *Helicobacter cinaedi*, isolated from canines. *Syst Appl Microbiol*. 2016, 39, 307-312.
14. Millikin R, Bianco CL, White C, Saund SS, Henriquez S, Sosa V, Akaike T, Kumagai Y, Soeda S, Toscano JP, Lin J, Fukuto JM. The chemical biology of protein hydropersulfides: Studies of a possible protective function of biological hydropersulfide generation. *Free Radic Biol Med*. 2016, 97, 136-147.
15. Yugami M, Odagiri H, Endo M, Tsutsuki H, Fujii S, Kadomatsu T, Masuda T, Miyata K, Terada K, Tanoue H, Ito H, Morinaga J, Horiguchi H, Sugizaki T, Akaike T, Gotoh T, Takai T, Sawa T, Mizuta H, Oike Y. Mice deficient in Angiopoietin-like protein 2 (Angptl2) gene show increased susceptibility to bacterial infection due to attenuated macrophage activity. *J Biol Chem*. 2016, 291, 18843-18852.
16. Tsutsuki H, Jung M, Zhang T, Ono K, Ida T, Kunieda K, Ihara H, Akaike T, Sawa T. Endogenous occurrence of protein S-guanylation in *Escherichia coli*: Target identification and genetic regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016, 478, 7-11.
17. Yoshitake J, Soeda Y, Ida T, Sumioka A, Yoshikawa M, Matsushita K, Akaike T, Takashima A. Modification of tau by 8-nitro-cGMP: effects of nitric oxide-linked chemical modification on tau aggregation. *J Biol Chem*. 2016, 291, 22714-22720.
18. Jung M, Kasamatsu S, Matsunaga T, Akashi S, Ono K, Nishimura A, Morita M, Abdul Hamid H, Fujii S, Kitamura H, Sawa T, Ida T, Motohashi H, Akaike T. Protein polysulfidation-dependent persulfide dioxygenase activity of ethylmalonic encephalopathy protein 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016, 480, 180-186.
19. Kasamatsu S, Nishimura A, Morita M, Matsunaga T, Abdul Hamid H, Akaike T. Redox signaling regulated by cysteine persulfide and protein polysulfidation. *Molecules*. 2016, 21, E1721.
20. Takahashi N, Wei FY, Watanabe S, Hirayama M, Ohuchi Y, Fujimura A, Kaitsuka T, Ishii I, Sawa T, Nakayama H, Akaike T, Tomizawa K. Reactive sulfur species regulate tRNA methylthiolation and contribute to insulin secretion. *Nucleic Acids Res*. 2017, 45, 435-445.
21. Kunikata H, Ida T, Sato K, Aizawa N, Sawa T, Tawarayama H, Murayama N, Fujii S, Akaike T, Nakazawa T. Metabolomic profiling of reactive persulfides and polysulfides in the aqueous and vitreous humors. *Sci Rep*. 2017, 7, 41984.

22. Ono K, Jung M, Zhang T, Tsutsuki H, Sezaki H, Ihara H, Wei FY, Tomizawa K, Akaike T, Sawa T. Synthesis of L-cysteine derivatives containing stable sulfur isotopes and application of this synthesis to reactive sulfur metabolome. *Free Radic Biol Med.* 2017, 106:69-79.
23. Abiko Y, Sha L, Shinkai Y, Unoki T, Luong NC, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Hirose R, Akaike T, Kumagai Y. 1,4-Naphthoquinone activates the HSP90/HSF1 pathway through the S-arylation of HSP90 in A431 cells: Negative regulation of the redox signal transduction pathway by persulfides/polysulfides. *Free Radic Biol Med.* 2017, 104, 118-128.
24. Ahmed KA, Zhang T, Ono K, Tsutsuki H, Ida T, Akashi S, Miyata K, Oike Y, Akaike T, Sawa T. Synthesis and characterization of 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate Rp-isomer as a potent inhibitor of protein kinase G1 α . *Biol Pharm Bull.* 2017, 40, 365-374.
25. Ihara H, Kitamura A, Kasamatsu S, Ida T, Kakihana Y, Tsutsuki H, Sawa T, Watanabe Y, Akaike T. Superoxide generation from nNOS splice variants and its potential involvement in redox signal regulation. *Biochem J.* 2017, 474, 1149-1162.
26. Ikeda M, Ishima Y, Shibata A, Chuang VTG, Sawa T, Ihara H, Watanabe H, Xian M, Ouchi Y, Shimizu T, Ando H, Ukawa M, Ishida T, Akaike T, Otagiri M, Maruyama T. Quantitative determination of polysulfide in albumins, plasma proteins and biological fluid samples using a novel combined assays approach. *Anal Chim Acta.* 2017, 969, 18-25.
27. Nishida M, Nishimura A, Matsunaga T, Motohashi H, Kasamatsu S, Akaike T. Redox regulation of electrophilic signaling by reactive persulfides in cardiac cells. *Free Radic Biol Med.* 2017, in press.
28. Alvarez L, Bianco CL, Toscano JP, Lin J, Akaike T, Fukuto J. The chemical biology of hydropersulfides and related species: Possible roles in cellular protection and redox signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2017, in press.
29. Shoda J, Shida T, Yamamoto M, Nagino M, Tsuyuguchi T, Yasaka T, Tazuma S, Uchiyama K, Unno M, Ohkochi N, Nakanuma Y, Matsuda A, Kuno A, Narimatsu H. Wisteria floribunda agglutinin-sialylated mucin core polypeptide 1 is a sensitive biomarker for biliary tract carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: a multicenter study. *J Gastroenterol* 2017, 52, 218-228.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「新規ガス受容体 PGRMC1 の構造的機能制御の解明」, 第 14 回日本ヒトプロテオーム学会, 加部泰明, 2016/7/28, 国内
2. 「新規ガス受容体 PGRMC1 の構造的機能制御の解明」, 第 89 回日本生化学会大会, 加部泰明 2016/9/26, 国内
3. 気道炎症と呼気 NO, 口頭, 赤池孝章, 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会, 2016/4/10, 国内.
4. Host defense and oxidative stress signaling in microbial infections, 口頭, Takaaki Akaike, The 13th Korea-Japan International Symposium on Microbiology, 2016/5/13, 国外.
5. Cysteine transfer RNA synthetases moonlighting as novel cysteine persulfide synthases (CPERSs), 口頭, Takaaki Akaike, The 9th International Conference on the Biology,

Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2016/5/21, 国内.

6. 生体防御応答のレドックス制御機構, 口頭, 赤池孝章, 第 27 回日本生体防御学会学術総会, 2016/7/8, 国内.
7. 新しい Cysteine Persulfide Synthase の発見とそのミトコンドリア機能制御, 口頭, 赤池孝章, 生理学研究所研究会「オルガネラネットワークの制御機構とその生理的意義」, 2016/7/28, 国内.
8. Cysteinyl-tRNA synthetase controls protein polysulfidation and mitochondrial functions, 口頭, Takaaki Akaike, The 2016 Thiol-Based Redox Regulation & Signaling Gordon Research Conference, 2016/8/10, 国外.
9. 新しい Cysteine Persulfide Synthase の発見とそのユニークなレドックス制御メカニズム, 口頭, 赤池孝章, 第 12 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム, 2016/8/18, 国内.
10. 活性システインパースルフィドによるレドックス制御の分子基盤, 口頭, 赤池孝章, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016/8/24, 国内.
11. 活性イオウ分子種によるミトコンドリア機能制御, 口頭, 赤池孝章, 井田智章, 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2016/8/30, 国内.
12. 生体内タンパク質ポリスルフィドの検出とその生成機構, 口頭, 赤池孝章, 笠松真吾, 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2016/8/30, 国内.
13. 細菌感染におけるレドックスシグナル制御機構, 口頭, 赤池孝章, 第 28 回微生物学シンポジウム, 2016/9/2, 国内.
14. Cysteinyl-tRNA synthetase is a major source of reactive persulfide and controls mitochondrial biology, 口頭, Takaaki Akaike, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/25, 国内.
15. 活性イオウ生成酵素の発見: ミトコンドリア形態形成とエネルギー代謝の新しいメカニズム, 口頭, 赤池孝章, 第 14 回がんとハイポキシア研究会, 2016/11/4, 国内.
16. 活性イオウ分子種: システインポリスルフィドの生体機能と代謝制御, 口頭, 赤池孝章, 第 19 回日本質量分析学会北海道談話会講演会, 2017/2/10, 国内.
17. Persulfide regulation of mitochondrial number and function, 口頭, Takaaki Akaike, The 2017 NO Gordon Research Conference, 2017/2/22, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

無

(4) 特許出願

無